

伊藤細胞制御化学研究室
Synthetic Cellular Chemistry Laboratory

主任研究員 伊藤幸成 (薬博)
ITO Yukishige (Dr. Pharm.)



キーセンテンス：

1. 糖鎖を合成する
2. 新しい合成法を開発する
3. 生物学的機能をしらべる

キーワード：

生体分子、有機合成化学、立体選択性、新規合成手法、糖鎖、糖タンパク質、小胞体、微生物糖鎖、糖鎖認識分子、固体 NMR

研究概要

糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン等の複合糖質は構成成分として糖が連なった糖鎖と呼ばれる部分を有している。糖鎖は細胞間の認識、分化やがん化等の細胞レベルでの生命現象と密接に関連していることが知られている。また、タンパク質の活性制御、安定化、フォールディング、輸送、分解過程においても重要な役割を担っていることも明確になりつつある。複雑で多様性に富んだ糖鎖の構築は生物学との境界領域の研究対象としても注目されているが、純粋有機合成化学の見地からも興味深い課題である。本研究室では、これらの背景をもとに複合糖質特に糖タンパク関連分子の精密合成、それに関連する分子プローブの創製に有効な新規反応や合成戦略、を中心に研究を行っている。主要研究テーマは 1) 新たな合成手法の開発と複合糖質関連分子プローブの創製、2) 複合糖質の生物機能解明と新規生物活性物質の創製をめざす合成研究、3) 合成化学的手法による糖タンパク質細胞内動態の解明、4) 糖鎖結合分子の認識機構解析、の 4 点である。

1. 糖タンパク質細胞内機能の解析 (伊藤、相川、坂本、中川、瀬戸、太田、高橋)

タンパク質の大部分は正しい三次元構造を獲得して初めて機能を発揮する。これを制御する過程はタンパク質の「品質管理機構」と呼ばれる。ヒトをはじめとする真核生物細胞の小胞体においては、さまざまな分子がこの過程に関与している。多彩な糖タンパク質糖鎖機能の中で、小胞体における品質管理機構は、細胞活動の根幹部分への関与を示すものとして糖鎖生物学における中心課題となりつつある。

我々は、小胞体内糖鎖を化学的に合成する手法を確立し、糖タンパク質品質管理機構において重要な役割を果たすカルレチユリン、UDP-グルコース：糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT) およびグルコシダーゼ II (G-II) を主たる対象として検討を行ってきた。一方、小胞体マンノシダーゼ I は、ミスフォールド糖タンパク質の分解過程において鍵を握る酵素として興味を持たれている。昨年度に続き、ヒト小胞体マンノシダーゼ I の糖鎖トリミング活性の解析を行い、本酵素がミスフォールド型糖タンパク質を優先的にトリミングする特異性を調べた。更に、擬似細胞内環境であるマクロ分子クラウディング条件が本酵素の活性に及ぼす影響を調べた。その結果、上記条件で、本酵素のミスフォールド糖タンパク質に対する活性が向上し、よりトリミングが進んだ生成物を与えることが分かった。

N-アセチルマンノノサミン (ManNAc) の生理活性に着目した研究を行った。ManNAc は細胞質 O-結合型 GlcNAc 生合成における供与体基質である UDP-GlcNAc から合成され、シアル酸含有糖鎖の生合成中間体である。共同研究者により、動物実験において ManNAc が行動や認知機能を改善する活性を持つことが報告されている。そこで、ManNAc の各種類縁体を合成し、その構造活性相関を調べた。その結果、ある種の ManNAc 誘導体が、オレキシン産生を強く亢進する活性を持つことが見出された。

2. 糖鎖および糖タンパク質合成手法の開発 (眞鍋、石渡、相原、Fulse、伊藤、高橋)

2,3-位に環状保護基を導入してコンフォメーションを制限した糖供与体による α -選択的グルコシル化反応の解析を行った。前年度までの研究で、グリコシド結合の異性化が容易に起きる機構について endo 型のグリコシド結合の解裂が起きていることが明らかになっており、計算科学的手法を用いてその定量的な解析と、メカニズムの理解に向けた検討が行われてきた。また、上記の糖供与体を用いる C-グリコシル化反応は、O-グリコシル化反応と同様に α -選択的に進行することが明らかとなり、その汎用性に期待がもたれる。

そこで、上記反応を活用し、ヘパロサン等 α -グリコシドを構成成分として持つ生物活性糖鎖の合成研究を行った。併せて、 α -GlcNAc からなる新規機能物質創製に向けた研究を行った。

タンパク質への糖鎖付加は真核生物のみならず、種々の微生物にも見られる。これらは細菌の病原性や免疫応答に密接に関与していることが明らかになりつつある。その中で代表的な Pseudaminic acid の改良合成を検討した。加えて、本年度は、植物の細胞壁成分糖ペプチド性ホルモンを構成する、オリゴアラビノフラノシドを選択的に合成する手法を確立した。更にこれを用いて、CLV3 と呼ばれる糖ペプチドの合成を達成した。前年度に引きつづき、結核菌細胞表層の巨大糖鎖複合体に関する研究を行い、合成糖鎖としては最大のアラビナン 31 糖の合成に成功した。

3. 糖鎖結合分子の認識機構解析 (中川、福永、伊藤、高橋)

Pradimicin A (PRM-A) は、放線菌由来の抗生物質であり、 Ca^{2+} 存在下でD-マンノース (Man) を認識する。現在のところ、PRM-Aとその誘導体は、「Man認識能を有する唯一の低分子化合物群」であることから、PRM-A類によるMan認識機構の解明は学術的に極めて重要な研究課題である。本年度は、昨年度に引き続き、固体NMRによるPRM-A/Man相互作用解析を進めた。PRM-A/Man複合体の詳細な dipolar assisted rotational resonance (DARR) 解析の結果、複合体中においてManの1位と6位は2-5位に比べてPRM-Aから離れた位置にあることが明らかになった。本結果は、Manの2, 3, 4位水酸基がPRM-Aとの結合に関与している一方で、1位と6位水酸基はPRM-Aに認識されていないことを示唆するものであり、PRM-AによるMan認識機構を解明する上で極めて有用な知見を得ることができた。

PRM-A は、Man を含む糖鎖に結合することにより、他に類を見ない抗菌作用および抗 HIV 作用を示す。現在のところ、PRM-A は糖鎖の非還元末端 Man 残基にのみ結合すると仮定されているが、上記の固体 NMR 解析の結果から、非還元末端以外の α -1,6 結合で連結している Man 残基にも PRM-A が結合する可能性が示唆された。そこで、マンノビオース誘導体を用いた結合試験により本可能性を検証したところ、PRM-A は6位に糖残基を有する Man 残基にも結合することが明確となった。本結果は、非還元末端以外の Man 残基に PRM-A が結合することを示した初めての例であり、PRM-A による抗菌および抗 HIV 作用のメカニズムを正確に理解する上で重要な知見である。

Key Sentence :

1. Synthesize glycan chains.
2. Develop new synthetic methods.
3. Study functions of glycoproteins.

Key Words : Biomolecules, Organic synthesis, Stereoselectivity, New synthetic methods, Glycans, Glycoproteins, Folding, Endoplasmic reticulum, Microbial glycans, Carbohydrate binding agents

Outline

This laboratory is working on the interface of synthetic chemistry and glycobiology. Glycoconjugates are involved in a variety of biological events such as cell-cell recognition, malignant transformation, cell differentiation, and signal transduction. In fact, a majority of proteins produced in eukaryotic cells are glycoproteins. Although syntheses of these classes of molecules are significant challenge, they are expected to provide useful molecular probes to clarify the biological functions of glycoconjugates. Our current research activities are directed to 1) development of novel synthetic methodologies and their application to glycoconjugate related molecular probes, 2) synthesis studies toward delineating biological functions of glycoconjugates and discovery of novel bioactive compounds, and 3) synthetic approaches to understand intracellular behaviors of glycoproteins especially in the ER, and 4) analysis of sugar recognition mechanism of carbohydrate binding natural products.

1. Analysis of glycoprotein processing by synthetic substrates (Ito, Aikawa, Sakamoto, Nakagawa, Seto, Ohta, Takahashi)

Most of proteins are functional only when they are correctly folded. The process that regulates and maximizes protein folding is called "protein quality control". In the endoplasmic reticulum (ER) of eukaryotic cells, many molecules play roles in this process.

High-mannose-type oligosaccharides, which are cotranslationally introduced to nascent polypeptides during N-glycosylation, play critical roles in protein quality control. Our particular interest has been directed to key enzymes of this process, UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) and glucosidase II (G-II). In continuation of our study on ER-mannosidase I, which is known to play critical roles in degradation of misfolded glycoproteins, its property to preferentially act on misfolded glycoproteins was conducted. In addition, effects of macromolecular crowding conditions, which mimic intracellular environments were studied, clarifying that the activity of this enzyme was markedly enhanced under such conditions.

Previous studies have suggested that N-acetylmannosamine (ManNAc), a biosynthetic precursor of sialic acid containing glycoconjugate, exhibits effects to improve brain functions such as recognition. Given this interesting information, we synthesized various analogues and derivatives of ManNAc to conduct structure-activity relationship studies. Interestingly, some of them exhibited activities to enhance production of orexin.

2. Development of synthetic methods for glycan chains and glycoproteins (Manabe, Ishiwata, Aihara, Fulse, Ito, Takahashi)

Analysis of stereoselective glycosylation using glycosyl donors carrying cyclic protection on 2,3-positions was conducted. Our study in previous years has provided novel findings as for the mechanism of facile isomerization of glycosidic linkages and evidences that endo-type glycoside bond cleavage took place. Further studies based on combined experimental and computational approach was conducted, which have led us to understand its mechanism. This year, to demonstrate versatility and practicality of this approach, studies toward synthesis of α -GlcNAc containing glycans such as heparosan, was conducted. A similar strategy has been a subject of a study directed to the creation of novel functional materials, such as chitin analogues.

Modification by glycan chains is often found in various prokaryotes, whose functions in microbial infection and pathogenicity are of recent interest. This year, development of improved synthetic method toward pseudaminic acid, a representative microbial glycoprotein glycan, was studied. In addition, synthetic strategy toward oligoarabinofuranoside containing peptides, which are widespread in various plants, was established.

In continuation of preceding years' study, synthesis of gigantic glycan conjugates of *Mycobacterium tuberculosis* was conducted, which resulted in successful construction of 31mer of arabinan, which is the largest among chemically synthesized glycans.

3. Analysis of molecular mechanism of carbohydrate binding agents (Nakagawa, Fukunaga, Ito, Takahashi)

Viruses such as HIV carry high-mannose-type glycans on their surface in a dense manner. Molecules that bind these glycans are known to have antiviral activities. Among them, prandimicin A (PRM-A) is particularly interesting as a drug candidate, because, in spite of its small molecular weight, it has an activity to selectively bind to mannose. We conducted analysis to understand the mode of its mannose-binding capability, using solid state NMR with mannose and PRM-A both of which were labeled by stable isotope. Our study has confirmed that PRM-A specifically forms complex with mannose in the presence of Ca^{2+} and obtained important finding as for the mode and sugar binding specificity of PRM-A. Further study gave information as for interacting sites of PRM-A and D-mannose. This year, we obtained results which suggest that 2-, 3-, and 4-OH of D-mannose play important role in binding with PRM-A, while 1- and 6-positions are scarcely recognized by PRM-A. Further evidences were obtained, which suggest that, not only terminal, but also penultimate mannose residues, especially that are substituted on the 6-position, exhibit binding activity toward PRM-A.

Principal Investigator

伊藤 幸成 Yukishige Ito

Research Staff

相川 順一 Junichi Aikawa
坂本 康治 Yasuharu Sakamoto
眞鍋 史乃 Shino Manabe
石渡 明弘 Akihiro Ishiwata
中川 優 Yu Nakagawa
高橋 明美 Akemi Takahashi
Fulse Dinanath Baburo
相原 義之 Yoshiyuki Aihara
瀬戸 秀春 Hideharu Seto

Students

福永 修也 Naoya Fukunaga

Visiting Members

太田 鋼 Tsuyoshi Ohta
蟹江 治 Osamu Kanie
武田 陽一 Yoichi Takeda
金森 審子 Akiko Kanamori
大竹 敦子 Atsuko Ohtake
鈴木 克彦 Katsuhiko Suzuki
迫野 昌文 Masafumi Sakono
大黒 周作 Shusaku Daikoku
八須 匡和 Masakazu Hachisu
小泉 晶彦 Akihiko Koizumi
孫 尚鉉 Sang-Hyun Son
Sophon Kaeothip